

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表2003 - 530892

(P2003 - 530892A)

(43)公表日 平成15年10月21日(2003.10.21)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)
C 1 2 Q 1/68		C 1 2 Q 1/68	A 2 G 0 4 5
C 1 2 N 15/09		1/34	4 B 0 2 4
C 1 2 Q 1/34		G 0 1 N 33/53	M 4 B 0 6 3
G 0 1 N 33/53		33/566	
33/566		33/58	A

審査請求 未請求 予備審査請求 (全 33数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 578696(P2001 - 578696)

(86)(22)出願日 平成13年4月20日(2001.4.20)

(85)翻訳文提出日 平成14年10月21日(2002.10.21)

(86)国際出願番号 PCT/GB01/01767

(87)国際公開番号 W001/081626

(87)国際公開日 平成13年11月1日(2001.11.1)

(31)優先権主張番号 0009784.0

(32)優先日 平成12年4月20日(2000.4.20)

(33)優先権主張国 イギリス(GB)

(71)出願人 シーメグ リミティド
イギリス国,バーミンガム ビー13 9エイ
チジェイ,モズレイ,メイフィールド ロー
ド 22

(72)発明者 ヒュルテン, マイ アニータ
イギリス国,バーミンガム ビー13 9エイ
チジェイ,モズレイ,メイフィールド ロー
ド 22

(74)代理人 弁理士 石田 敬 (外4名)

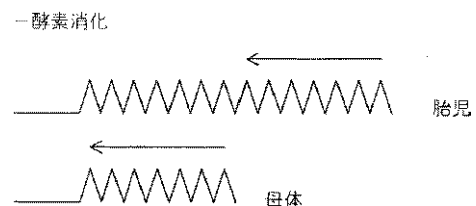
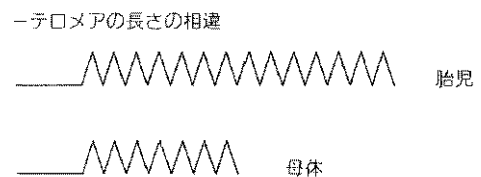
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 臨床診断のための方法

(57)【要約】

母体血液または臍試料中の、胎児細胞核、染色体またはDNAを同定する方法であって、(a) 当該試料中の細胞核の染色体を酵素によるエキソヌクレアーゼ消化に付して各染色体の末端領域を除去し、そして(b) この消化プロセスの結果、胎児DNAに残存し母体DNAには存在しないDNA配列の存在を検出する、事を含む方法。同定したならば、この胎児DNAを、例えば染色体異常を検出するための診断に付すことができる。

テロメアの相違



【特許請求の範囲】

【請求項1】 母体血液または臍試料中の、染色体およびDNAを含有する胎児細胞核を同定する方法であって、(a) 当該試料中の細胞核の染色体を酵素によるエキソヌクLEASE消化に付して各染色体の末端領域を除去し、そして(b) この消化プロセスの結果、胎児染色体に残存し母体DNAには存在しないDNA配列の存在を検出する、事を含む方法。

【請求項2】 細胞核の染色体および構成DNAが細胞内部でin situエキソヌクLEASE消化に付されるよう、該酵素を細胞中に導入する、請求項1に記載の方法。

【請求項3】 リゾレシチン、サポニンまたはトリトンX100のような試薬の投与により、核膜を該酵素に対して透過性とする、請求項2に記載の方法。

【請求項4】 予備工程において細胞核の染色体をカルノワ（酢酸：メタノール、3:1）またはホルムアルデヒドへの暴露といった標準技術により固定する、請求項1に記載の方法。

【請求項5】 胎児染色体に残存している該DNA配列がテロメア配列である、前記請求項のいずれか1項に記載の方法。

【請求項6】 該DNA配列を、その配列に特異的な一次標識化プローブを用いて検出する、前記請求項のいずれか1項に記載の方法。

【請求項7】 標識が蛍光標識である、請求項6に記載の方法。

【請求項8】 同定される胎児細胞核をフローソート法によって母体細胞から分離する、前記請求項のいずれか1項に記載の方法。

【請求項9】 染色体およびDNAを含む胎児細胞核を蛍光in situハイブリダイゼーション検定（FISH）を用いて同定する、請求項1ないし7のいずれか1項に記載の方法。

【請求項10】 酵素がBAL31である、前記請求項のいずれか1項に記載の方法。

【請求項11】 第一工程において3'伸長DNAを除去し、第二工程において3'-5' ss領域を切り取り、そして第三工程においてss領域を消化するという工程でエキソヌクLEASE消化を実施する、請求項1ないし12のいずれか1項に記載

の方法。

【請求項12】 第一工程を緑豆ヌクレアーゼを用いて実施する、請求項11に記載の方法。

【請求項13】 第二工程をエキソヌクレアーゼIIIを用いて実施する、請求項11または請求項12に記載の方法。

【請求項14】 第三工程を緑豆ヌクレアーゼを用いて実施する、請求項11ないし13のいずれか1項に記載の方法。

【請求項15】 同定された染色体およびDNAを含む胎児細胞核を出生前診断に付す、前記請求項のいずれか1項に記載の方法。

【請求項16】 診断が染色体異常を検出する、請求項15に記載の方法。

【請求項17】 特定の染色体に特異的、または特定の染色体セグメントのDNAに特異的である1またはそれ以上の二次標識化プローブと試料を接触させることによって該診断を実施する、請求項15または請求項16に記載の方法。

【請求項18】 二次プローブが蛍光標識を持っている、請求項17に記載の方法。

【請求項19】 胎児の染色体セグメントおよびDNA配列を、蛍光標識化一次プローブを用いて検出し、二次プローブは第一プローブとは異なる波長で蛍光を発する蛍光標識を持ち、ここで、胎児の染色体セグメントおよびDNA配列は、該第一標識由来の蛍光を検出することによって検出し、同定したならば、検出された蛍光の波長を第二プローブのそれに変え、両方のプローブ由来の蛍光が同じ細胞核から放射されているか、それによって異なる染色体セグメントおよびDNA配列を同定するか否かを判断する、請求項17または請求項18に記載の方法。

【請求項20】 二次プローブが第18、21、13、XまたはY染色体に特異的である、請求項17または19のいずれか1項に記載の方法。

【請求項21】 二次プローブが1またはそれ以上の特定の染色体セグメントに特異的である、請求項17ないし20のいずれか1項に記載の方法。

【請求項22】 母親の状態の診断に使用する、請求項1ないし15のいずれか1項に記載の方法。

【請求項23】 該状態が子癩前症、早期分娩の危険度の予測、及び後の自

己免疫疾患の発現である、請求項22に記載の方法。

【請求項24】 母体試料中の胎児細胞の量または濃度を測定する、請求項15、請求項22または請求項23に記載の方法。

【請求項25】 母体血液または腔試料中の染色体およびDNAを含有する胎児細胞核を同定するためのキットであって、染色体の末端セグメントを消化できるエキソヌクレアーゼ酵素、および、染色体の末端セグメントに見出される特異的DNA配列を検出するための標識化プローブを含むキット。

【請求項26】 標識化プローブが蛍光標識化プローブである、請求項25に記載のキット。

【請求項27】 染色体/DNAの状態の診断ができる二次標識化プローブをさらに含む、請求項25または請求項26に記載のキット。

【請求項28】 二次標識化プローブが蛍光標識化プローブである、請求項27に記載のキット。

【請求項29】 実施例に関連して実質上本明細書前記のように記載された、母体血液または腔試料中の染色体およびDNAを含む胎児細胞核を同定するための方法。

【請求項30】 実質上本明細書前記のように記載された、母体血液または腔試料中の染色体およびDNAを含む胎児細胞核を同定するためのキット。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

本発明は、血液または臍試料のような母体試料中の胎児の細胞核およびその中の遺伝物質、例えばDNAまたは染色体の同定のための方法に関するものである。この方法で同定した胎児の遺伝物質は、その後例えば出生前診断に使用できる。

【0002】

染色体異常は人間の最も一般的な遺伝子疾患の1つである。構造的染色体疾患は、その発生数が、妊娠の第一 trimester 中の流産に伴う死亡の50%以上および子宮内または周産期死亡の5%前後に及ぶ。さらに、生きて産まれた子供の0.5%が構造的染色体異常を持っている。

染色体異常は数値上または構造上のいずれにおいても存在し得る。身体組織における正常な二倍体染色体数46からの変化を意味する数値上の異常は、トリソミー（1個の余分な染色体）、モノソミー（1個の染色体の欠損）および倍数性（余分な一組全体の染色体）を包含する。染色体の破壊とその後の損傷した染色体末端の異常な位置における治癒が引き起こす構造的再配列は、いわゆる転座、逆位および挿入を包含する。

【0003】

構造的染色体再配列は、均衡形で起こり得、この場合遺伝物質は正常と同じに維持される。構造的染色体異常のキャリアーは通常何ら症状を示さない（損傷が切断点の遺伝子に起こらない限り）。構造的染色体異常は非均衡形でも起こり得、この場合、幾らかの遺伝物質が除去および/または倍加されている。これは通常、身体的および精神的ハンディキャップを伴って生きて産まれた子供を包含する発達遅滞につながる。

【0004】

人間集団において実体として起こる最も一般的な染色体異常はダウン症候群に伴う21トリソミーである。生きて産まれた子供の1/650前後が、幾分重篤な精神運動発達遅滞を特徴とする21トリソミーダウン症候群に罹患しているということが一般的に認められている。全世界の異なる国々で21トリソミーダウン症候群の発生率に実質的な差異は無い。

【0005】

小児期および成人期における21トリソミーダウン症候群の診断は通常、血液リンパ球のインビトロ培養後の染色体分析によって行う。標準染色体バンディング技術による個別同定のために染色体を充分濃縮した場合、この細胞培養操作は、細胞周期の中期の細胞を充分蓄積させるのに2-3日かかる。

標準型21トリソミーダウン症候群の子供を持つことについての、明確に証明されている唯一の臨床危険因子は、母親の年齢に関係している。即ち、母親の年齢が進むにつれ21トリソミーの子供を持つ危険度が増加するということが一般的に認められており、その危険度は、45歳以上の最高年齢群では妊娠の10%以上となり得る。21トリソミーの子供を妊娠している可能性の高い女性を同定する妊娠女性のスクリーニングプログラムが存在している。これらのスクリーニングプログラムは、母親の血液試料を生化学的性質について分析すること、および、特に頸部の皮膚の厚さを調べる目的で胎児を超音波検査することを包含している（この厚さはダウン症候群とその他の幾つかの染色体異常を持つ胎児において特徴的に増大する）。

【0006】

或る年齢、通常35歳以上の妊娠女性、およびスクリーニングプログラムで危険度の増大があると同定された女性は、慣例として、染色体分析用の胎児細胞サンプリングを行うための侵襲性操作（絨毛膜絨毛サンプリングおよび/または羊水穿刺）を提示される。このような侵襲的方法は、母親にとって苦痛であると同時に流産の危険度の増大が伴う。それ故、このような侵襲性サンプリング法に頼らずに出生前診断を実行する、より有効な方法を提供する必要がある。

【0007】

胎児の細胞が、妊娠中に母親の血液中に検出でき、およそ10000ないし1000万分の1存在するという事はよく知られている。さらにこの事が、最も一般的な21トリソミーダウン症候群のような胎児の状態の「非侵襲的」出生前診断の可能性を提供するという事もよく認識されている。

ダウン症候群およびその他幾つかの胎児の細胞遺伝学的状態、ならびに妊娠の合併症、例えば子癇前症および早期分娩ならびに自己免疫疾患の分娩後発症は、

母体血液中の胎児細胞をより高レベルに導く胎児母体輸血の増大を特徴とするかも知れない (Pertl and Bianchi Semin Perinatol 23, 5, 393-402, 1999の総説 ; Bianchi Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 92, 1, 103-8, 2000)。

【0008】

特に免疫検出系と、これに続く染色体特異的プローブによる蛍光in situハイブリダイゼーション (FISH) を用いる染色体数の計数、を使用して、母体血液中の胎児細胞の同定に多大な努力と膨大な資金が捧げられてきた (Hahn et al. Mol Hum Repr 4, 6, 515-521, 1998, 論説中の総説)。

妊娠女性から、より侵襲性の低い方法を用いて得た試料は、幾らかの母体細胞と比較的少数の胎児細胞を含むのが普通である。胎児細胞単離の現行方法は、抗体、勾配分画、優先的母体細胞溶解、および細胞選別の使用を包含する。しかしながら母体細胞は依然として、回収されるいかなる胎児細胞をも凌駕する傾向がある (例えばAl-Mufti et al Amer J Med Genet 85, 1, 66-75, 1999を参照されたい)。このような技術が可能であるという指摘によって生ずる関心は大きいものの、これらの試料を非侵襲的生前診断に使用することに伴う著しい困難が依然としてある (Hulten, The Lancet, 357, 963-4, 2001)。

【0009】

染色体の末端を覆っている反復DNA配列を構成するテロメアは、若年者は老年者より多数の反復を持つというふうに異なっていることがよく知られている。DNA複製はテロメア反復の最末端では起こらないと考えられる。この事は、細胞分割の度にテロメアが前より短くなることを意味している。この短縮が最終的には細胞死につながるという事もまた考えられる (De Lange, Science 279, 334-335, 1998の総説)。

【0010】

全てのヒト染色体のテロメアは同じDNAコア反復を含んでいる。個体の年齢に伴うテロメア長の変化は全ての染色体で観察される普遍的現象である。個体の年齢に応じてテロメアの反復長の変化はおよそ2-30KbのDNAであると見積もられている。

染色体に特異的なテロメア長は、特別なソフトウェアおよびテロメアプローブ

とハイブリダイズさせた染色体の顕微鏡画像分析を用いて測定できる (Poon et al Cytometry 36, 267-278, 1999)。これらの研究は、個体の染色体のテロメア含有量には個々の細胞核の間で幾らかの変異があるかも知れないことを示している。にもかかわらず、既に述べたように、対象の年齢に伴うテロメア長の実質的な減少がある。これに基づくと、胎児細胞の個々の染色体のテロメア長は新生児より長く、成人よりはさらに長いに相違ない (De Pauw et al Cytometry 32, 3, 163-1690を参照されたい)。故に、胎児細胞は、母親由来の細胞よりもより長いテロメアを持つ、即ち染色体あたりのテロメアDNA反復のコピー数がより高いことが暗示される (Friedrich et al Pediatr Res 49, 2, 256-6, 2001)。

【0011】

出願人は、この性質を、血液または血清試料のような母体の組織試料に存在する母体および胎児間の細胞核および/またはその中の遺伝物質、特に染色体およびDNAの識別のための基礎に使用できることを発見した。

したがって本発明によれば、母体血液(血清または血漿成分を包含する)または臍試料中の胎児細胞核、染色体およびDNAを同定する方法であって、(a) 当該試料中の細胞核の染色体を酵素によるエキソヌクレアーゼ消化に付して各染色体の末端領域を除去し、そして(b) この消化プロセスの結果、胎児細胞核に残存し母体細胞核には存在しないDNA配列の存在を検出する、事を含む方法が提供できる。

【0012】

実際において本発明は、母体組織試料中の胎児細胞核を直接同定するための基礎として、胎児および母体DNA中のテロメア反復の数の相違を利用する。工程(a)の最中に、細胞核中の染色体のDNAを末端領域から内側へと消化する。試料に存在する全染色体のテロメアセグメントがまずこのプロセスの間に消化される。エキソヌクレアーゼ消化は少なくとも母体の全テロメアDNA配列を除去するに十分な時間実施する。

【0013】

消化をこの時点で停止させたならば、胎児の染色体は幾らかのテロメアDNAを保持しているであろう。次いでこのDNAを、例えば、この状況では胎児DNAとのみ

ハイブリダイズする、テロメアDNAに特異的な標識化プローブを用いて検出することができる。

好ましくはこの方法は、血清および/または血漿成分を包含する母体血液試料を用いて実施する。「血液試料」という表現は、本明細書中では、標準技術により有核細胞がそこから単離された全血、血清または血漿を包含する。

【0014】

この方法は細胞においてin situで実施できる。この場合、エキソヌクラーゼ酵素を核膜を介して細胞核の中に導入する。これらは、例えば核膜を穿孔するためのリゾレシチン、サポニンまたはトリトン X100のような酵素を用いてこの目的のために透過可能とすることができる。

予備的工程において、細胞由来の染色体を、カルノワ（酢酸：メタノール3:1）またはホルムアルデヒドのような固定液を用いる標準技術によって分析用に固定する。

【0015】

工程(b)で検出する配列が染色体マーカーである場合、それが近テロメア（サブテロメアまたはテロメア）染色体マーカーであるのが好ましいかも知れない。何故なら、これは、マーカー自体が出生前診断に有用である可能性が生ずるためである。いずれにせよ、染色体およびDNAを含む胎児細胞核の同定が、「非侵襲的」出生前診断への予備工程として使用できる。

【0016】

特に好ましい態様では、消化後の試料に存在するDNAを、該DNA配列、例えばテロメア配列に特異的な第一の標識化プローブとハイブリダイズさせる。最も好ましくは、この第一プローブは、可視的標識、とりわけ蛍光標識で標識し、この試料由来の蛍光を検出する。これはin situ、例えば細胞スライド上で実施でき、またはこれに代わりフローソート法を用いて母体細胞核から胎児細胞核（蛍光標識化されている）を分離できる。

【0017】

エキソヌクラーゼ消化の実施に好適な酵素はBAL31を包含する。より調節可能な消化プロセスを保証するため、DNAの特異的領域のみを消化する酵素を使用

するのが好ましい。特に、消化は3工程のプロセスで実施し、第一工程では3' 伸長DNAを除去し、第二工程では3' -5' ss領域を切り取り、そして第三工程ではss領域を消化する。第一および第三工程の実施に好適な酵素は緑豆 (Mungbean)ヌクレアーゼを包含し、第二工程に関しては、好適な酵素はエキソヌクレアーゼIIIを包含する。

【0018】

染色体およびDNAを含む母体および胎児細胞核の識別を可能にする信頼できる消化を提供するために必要な、酵素濃度、緩衝液系、温度およびインキュベーション時間といった条件は、注意深い選択を必要とし、使用する個々の酵素といった因子に依存する。

異なる染色体末端間のテロメアDNA配列反復の数における変異の結果、最初に酵素系を、好ましくは染色体に特異的なやり方で「評定」することが望ましい。この型の評定は、様々な条件下で染色体のテロメアのエキソヌクレアーゼ消化の結果を分析することによって実施できる。

【0019】

特に酵素系を評定するもう一つの手段は、母体および胎児組織試料において各々の個別的染色体末端のテロメア長に関する基線情報を得ることである。これは、細胞サイクルの中期におけるテロメアDNA配列の蛍光in situハイブリダイゼーション (FISH) を用いて実行できる。各染色体末端の1つ1つのテロメアを、サブテロメアDNAプローブと組み合わせたテロメアによるFISHを用いて目立たせることができる。テロメア配列の測定は、Comparative Genomic Hybridisation (CGH) ソフトウェアプログラムを用いて顕微鏡画像分析により実施できる。

【0020】

分娩時に取得した、臍帯穿刺を受けた胎児由来の血液試料および臍帯血試料もまた、母体および胎児組織試料の各染色体腕についてのテロメアDNA配列の長さの正常変異に関するさらなる基線情報を得るために利用することができる。本発明方法を用いて同定したならば、胎児DNA、染色体または細胞核を出生前診断に付して、例えば染色体/DNA異常、例えばダウン症候群、エドワード症候群またはクラインフェルター症候群の存在、または胎児の性別といったその他の情報を

決定することができる。

【0021】

さらに、本発明方法を用いて得られる情報、特に母体試料中の胎児細胞の濃縮の量に関する情報は、出生前スクリーニング/診断および母体の状態の範囲の診断に有用である。これらは、子癩前症のような妊娠時の合併症、早期分娩の危険度の予測、そして後の自己免疫疾患の発現を包含する。

染色体異常の出生前診断を行う特別の方法は、プローブが試料内部のDNAとハイブリダイズする条件の下で、試料を、特定の染色体またはDNAの診断領域に特異的な第二の標識化プローブと接触させる事によって達成できる。故に、既に胎児起源であることが同定されている核、染色体またはDNA中のこの第二プローブの検出が、胎児についての情報を提供する。個別的診断目的に応じて、この第二プローブが第18、21または13、および/またはXもしくはY染色体に特異的であるならば有用である。

【0022】

X/Y、13、18および21のためのFISHプローブの組み合わせは、任意抽出の妊娠における羊水試料の全染色体分析(核型解析)により現在同定されている全異常の約70%を検出すると予想される。高危険度妊娠(例えばいずれかの親が転座とといったような構造的染色体異常の分かっているキャリアーであるという家族歴によって確認されている、または胎児の構造異常が超音波によって検出されている)を除くと、検出比率は99%以上に増大する。異なる型の異常に特異的なプローブが使用できるという事にもまた留意すべきである。

【0023】

好ましくは、前記の第二プローブは蛍光標識のような可視的標識を持っている。本発明方法の特に好ましい態様では、工程(b)において、胎児DNA配列は第一の蛍光標識したプローブを用いて検出し、第二プローブは第一プローブのそれとは異なる波長で蛍光を発する蛍光標識を持つ[ここで胎児DNAは第一の標識由来の蛍光を検出することによって検出する]。同定されたならば、検出される蛍光の波長を第二プローブの波長に変え、両方のプローブ由来の蛍光が類似の細胞核、染色体またはDNAから放射されているかどうかを調べる。これは、例えば使用す

る蛍光検出機のフィルターを変えることにより、容易に達成できる。

【0024】

好ましい選択肢において、目的とするサブテロメアマーカ-は、各染色体腕内部の染色体にユニークなDNA配列のなかでもできるだけ遠位に位置するべきである。これらのマーカ-は、位置に関して個別的に各染色体末端について前もって選択しておく。選択したDNAマーカ-は、染色体特異的なユニークDNAを含むサブテロメア染色体位置に局在させることが戦略的に適当である。この位置は1つの主たる理由で好ましい。

【0025】

サブテロメアまたはテロメア染色体 / DNAマーカ-の使用は数的染色体異常（例えばトリソミー）の定量のみならず、幾つかの比較的ありふれた不均衡な構造的染色体再配列、例えば不均衡転座の定量をも可能にする。不均衡な転座は、いずれの染色体が転座に関わっているかに応じて、別の染色体特異的サブテロメアまたはテロメアマーカ-の除去と組み合わせられた1個の染色体特異的サブテロメアまたはテロメアマーカ-の重複として同定される。さらに、その他の比較的ありふれた染色体異常もこのようにしてまたは類似の方法で同定できるに相違ない。これらには、胎児の奇形および / または精神運動発達遅滞を伴う余分のマーカ-染色体、例えば胎児 iso 12p、iso 18p、または isodic 15を包含し、これらは正常な状況に比して4個の余分なマーカ-を生ずる。

【0026】

出生前胎児診断で使用する蛍光DNAマーカ-を適当に選択することにより、胎児の発達障害を導く大多数の染色体異常をこの方法を用いて決定することができる。これらは後に説明するようにダウン症候群、クラインフェルター症候群およびエドワード症候群を包含する。

本発明の或る態様では、血液試料（血漿または血清成分を包含する）のような母体組織試料を取得し、分裂していない細胞である有核細胞を、常套法、例えば Lymphoprep（Sigma）または Percoll（Amersham Pharmacia）法を用いてそこから単離する。

【0027】

次に細胞核の膜を、標準法、例えば化学物質リゾレシチン、サポニンまたはトリトンX100への暴露を用いて透過性とする。

次の工程では、細胞核の染色体をカルノワ固定液（酢酸：メタノール3:1）またはホルムアルデヒドへの暴露といった常套的技術によって固定する。

次いでこの細胞核を顕微鏡スライド上に塗布し、母体テロメアを消化し幾らかの胎児テロメアDNAを残すに十分な時間、BAL31のようなエキソヌクLEASE酵素と共にインキュベートする。

【0028】

汎テロメア標識化プローブ、例えば蛍光標識したプローブをこの細胞に適用する。このプローブは、胎児細胞核の染色体のテロメアセグメントには付着するが、テロメアセグメントを失ってしまっている母体細胞核の染色体とは相互作用しない。

この時点でスライドを調べると、胎児細胞核は蛍光を発し、母体細胞核は発しない。別法として、蛍光性の胎児細胞は当分野で既知のフローサイトメトリー法を用いて母体細胞から分離できる。

【0029】

特別の態様では、別の標識を行った二次的プローブを、分離後の細胞に導入する。この別の標識を行ったプローブは、可視的標識、例えば異なる蛍光標識（発蛍光団）をも持っている事が適当である。胎児細胞由来のDNAが第二プローブに結合したか否かは、当分野で周知のように蛍光顕微鏡および分離フィルターを用いて決定できる。

【0030】

一般的に用いられる発蛍光団は、DAPI、フルオレセイン、FITC、Cy3、Cy5、ローダミン色素およびテキサスレッドを包含する。

本発明のさらなる態様に従い、母体血液または腔試料中の胎児細胞核、染色体およびDNAを同定するためのキットであって、DNAの末端領域を消化できるエキソヌクLEASE酵素、および、染色体の末端領域に見出される特異的DNA配列を検出するための標識化プローブ、例えば蛍光標識されたプローブを含むキットが提供される。

【0031】

このキットは、上記の方法の実行に必要な1またはそれ以上のさらなる試薬または物品を含み得る。特に、このキットは、特定の染色体セグメントの中の或るDNA配列に特異的な第二の標識化プローブ、例えば別な蛍光標識を行ったプローブをさらに含むことができ、故に異なる染色体条件の診断ができる。

このキットはさらに、有核細胞の単離のための試薬（例えばPercollまたはLymphoprep）および/または核膜の穿孔のための試薬（例えばリゾレシチン、サポニンまたはトリトンX 100）および/またはテロメアの消化のためのエキソヌクレアーゼ酵素（例えばBAL 31）を含んでいてよい。

【0032】

胎児細胞核自体の独立した同定が、信頼できる非侵襲的出生前診断にとって必須であるということに留意することが重要である（Hulten, The Lancet, 357, 963-4, 2001）。本発明がこれを達成する手段を提供する。

他方では、当分野で周知のように、様々な組み合わせの発蛍光団（直接的または間接的に標識されている）を、テロメア配列および染色体特異的配列の同定のための異なるFISH着色シグナルのために使用できるという事にも注目すべきである。FISH自体は現在急速に発展しつつある分野である。

【0033】

最後に、他の研究者が記載したように、FISH-FISH法は、特にこれに代わる技術に比して本来単純且つ迅速であると認識する事が重要である。濃縮および調製物作製の合計実施時間は、in situハイブリダイゼーションを含めて6時間前後である。幾つかの工程は自動化の適用に向いている。これは顕微鏡分析にも当てはまり、この場合、市販のコンピューターソフトウェアを用いる自動化蛍光スポット計数が既に研究室内に存在する。

【0034】

ここで本発明を、添付の図を参照し実施例によって個別的に説明するが。

実施例1

成人女性血液試料および羊水試料（胎児有核細胞を含有する）から有核細胞を単離した。二種類の細胞型を、1/10、および1/100から1/1000 vol%までの範囲の

異なる比率で胎児および成人細胞を含む懸濁液に混合した。

【0035】

その後懸濁液をリゾレシチンに暴露して細胞/核膜の透過性増大を誘発し、続いて固定および顕微鏡スライドの作製ならびにエキソヌクレアーゼによるDNA消化を行った。次いでこれらの細胞を汎テロメアプローブとハイブリダイズさせ、その後蛍光顕微鏡分析用の染色体特異的プローブとハイブリダイズさせた。

1) 細胞調製

EDTA管に入れた新鮮血10mlを燐酸緩衝化食塩水(PBS)10mlと混合した。次にLymphoprep (Nycomed Pharma AS、オスロ、ノルウェー)10mlを50ml管に入れ、希釈した血液10mlをその上にゆっくりと積層した。

【0036】

管を2000rpmで30分間遠心分離した。次に、血漿の直下のリンパ球の薄層を管を傾けて除去し、細いピペットを用いて細胞の層(3-5ml)を吸引した。この後、分離したリンパ球をPBSで希釈し20mlまでの最終容量とした。次いでこれらの細胞を2000rpmで15分間遠心分離した。上清を廃棄し、細胞ペレットをPBS5mlに溶解した。

【0037】

雄性21トリソミー妊娠由来の羊水試料を2000rpmで15分間遠心分離した。上清を注意深く廃棄し、細胞ペレットをPBS5mlに再懸濁した。

2) 細胞混合物

成人女性細胞および雄性胎児細胞試料の異なる混合物を10mlの最終溶液となるように調製した。胎児対成人細胞の比率は1/10、1/100および1/1000 vol%まで変化させた。

【0038】

3) 細胞/核膜の透過性増大化

リンパ球と羊水試料の混合物にリゾレシチン(酢酸ナトリウム中5 μ g/ml)を添加した。これらの細胞を4 $^{\circ}$ Cで2分間インキュベートした。パラホルムアルデヒド2.5mlの添加により反応を停止させた。次にこの細胞を2000rpmで15分間遠心分離し、1%牛血清アルブミン(BSA)を含有するPBSで2回洗浄した。

【0039】

4) スライドの作製および固定

細胞懸濁液200 μ lを清浄なスライドに乗せ、放置乾燥させた。次に2%ホルムアルデヒド200 μ lをスライド上に加えることで細胞を固定し、10分間放置した。次いでこのスライドをPBSで洗浄し、エタノール系列で脱水した。

5) エキソヌクレアーゼ酵素消化

スライドをホットプレート(40-50)上で2時間エージングさせた。スライドあたり50 μ lの緩衝液に入れたBaI 31酵素(New England Bio labs)1-5単位で酵素消化を実施した。スライドを37 のホットプレート上に10分間置いた。室温でスライドを2xSSCで洗浄することにより酵素反応を停止させた。次いでスライドをエタノール系列で脱水し、風乾した。

【0040】

6) テロメアのためのPNA FISH

汎テロメアPNAキット(Dako, Glostrup, デンマーク)使用のための製造者の推奨に従い、スライドを、トリス緩衝化食塩水(TBS)、3.7%ホルムアルデヒドおよび前処理溶液で洗浄した。次にスライドをエタノール系列で脱水し、風乾した。各々のスライドにFITC標識化プローブ10 μ lを加え、カバーガラスで覆った。スライドを80 で3分間、次いで遮光下に室温で30分間インキュベートした。このスライドをすすぎおよび洗浄溶液にかけ、エタノール系列で脱水した。風乾後、DAPIを含有するVectashield(Vector Laboratories, Peterborough, 英国)で対比染色し、カバーガラスで覆い封入した。

【0041】

7) Vysis異数性検出キットを用いる第21、13、18、XおよびY染色体に特異的なプローブとのハイブリダイゼーション

アセトンに2分間浸漬することによってスライドからカバーガラスを除去した。次にこのスライドを脱水および風乾した。ダイヤモンドの先端を持つ筆記具を用いてスライド上にハイブリダイゼーション領域の印を2個付けた。標的DNAを70%ホルムアミド:30% 2xSSCに73 で5分間浸漬することによって変成させた。CEP 18/X/Yプローブミックス10 μ lを標的領域1に適用し、LSI 13/21プローブミック

ス (Vysis, 米国) 10 μ l を標的領域2に適用し、プローブ溶液をカバーガラスで覆った。カバーガラスをゴムのりを用いて密封し、スライドを、37 $^{\circ}$ C インキュベーター中の前もって温めておいた加湿容器に16時間または一夜入れた。カバーガラスを除去し、スライドを73 $^{\circ}$ C の0.4xSSC/0.3% NP-40溶液で2分間洗浄した。次いでスライドを室温の2xSSC/0.1% NP-40溶液に1分間入れた。完全に乾燥したならば、DAPI II対比染色液 (Vysis, 米国) 10 μ l を標的領域に適用し、カバーガラス下に密封した。

【0042】

8) 顕微鏡検査

スライドをx100対物レンズを付けたZeiss axioplan epifluorescence顕微鏡を用いてスクリーニングした。適当なフィルターを用いてシグナルを観察し、SmartCaptureソフトウェア (Vysis, 米国) を用いるCCDカメラを使用して画像を取得した。カバーガラスの左上角からスライドのスキャンを開始し、上から下まで動かした。

【0043】

分析は、最初FITCフィルターを用いるテロメア蛍光に関して実施した。陽性および陰性細胞の位置をEngland Finder (Graticules Ltd, Kent, 英国) を用いて記録した。その後、それぞれYおよび第21染色体の同定と計数について、細胞核を橙色フィルター (Vysis, 米国) を用いて領域1および2に関して再調査した。

9) 結果

FITCフィルターを用いる蛍光顕微鏡検査は、幾つかの細胞核にテロメアシグナルを示し、一方他の核ではシグナルは無いかまたは殆ど無かった。これらのテロメアシグナルを示す核の比率は、調製し分析した胎児および成人細胞核の混合物から予想された比率に相当した。即ち、胎児細胞の濃度が低いほど非蛍光性核の比率が高く、逆もまた真であった。細胞核の適当な集団の画像を捕捉し、それらの位置を記録した。(図2Aおよび3A)。

【0044】

この後、Y染色体と3個の第21染色体シグナルを持っていると予想される胎児雄性21トリソミー核の同定のため、橙色フィルター (Vysis, 米国) を用いて同じ細

胞集団を分析した。細胞ミックスの種類(1/10、1/100、1/1000 vol%の胎児対成人細胞)あたり合計1000個の核を、スライドの領域1におけるYシグナル、スライドの領域2における第21染色体シグナルについて分析した。

【0045】

テロメア蛍光を持ち、故に胎児のものであると解釈できる核、およびYシグナルの存在の間に97.3%の対応が見出された。Y蛍光についてのこの結果は、純粋な胎児細胞集団の対応する分析で見出されたものと一致し、それは製造業者のマニュアルによると95-100%であった。(図2B)。

テロメア蛍光を持ち、故に胎児のものであると解釈できる核、および3個の第21染色体シグナルの存在の間には、僅かに低い対応が見られた。これは反復実験において83-90%の間で変化した。しかしながらそれでもこれらの結果は、胎児トリソミーの症例において羊水試料で本発明者等が常套的に記録している結果に相当し、製造業者のマニュアルに記録された範囲内である。(図3B)。

10) 解釈

これらの結果は、経時的なテロメアの酵素消化の後の、テロメアおよび染色体特異的プローブの二元的FISH分析を使用して、胎児および成人の細胞を識別することが可能であることを証明している。

【0046】

実施例2

母体血液からの、胎児47,XY+21ダウン症候群の出生前診断

1. 妊娠および血液試料

地域倫理委員会からの倫理上の承諾と共に書面でのインフォームドコンセントを得た後、在胎齢16週の妊娠女性から静脈穿刺により血液12mlを採取し2本のエドト酸(EDTA)管に入れる。

【0047】

[この、および後の実施例では、比較的少量の血液を使用した。より大量の母体血液試料は、より多数の胎児細胞を集めることができ、故に好ましいという事に留意すべきである。]

【0048】

2. 胎児細胞の濃縮

母体血液由来の血漿中の胎児有核細胞の濃縮を、些少の改変を施した記載のプロトコル (Ganshirt et al., Diagnostic Cytogenetics, Springer Lab Manual, 1999 R.-D. Wagner, Fetal Cells in Maternal blood, pp401-415) に従い Triple Density Gradient を用いて実施する。

【0049】

EDTA血液12mlを燐酸緩衝溶液 (PBS) 12mlに加え、管を逆さにすることにより混合する。この血液/PBS混合物6mlをピペットで4本の15mlポリスチレン管に入れる。注射筒に取り付けた細長いカニューレを用いて3層のPercoll (登録商標) (Amersham Pharmacia) を下層に積層する。最初に40% Percoll 3mlを、その後45% Percoll 3mlおよび50% Percoll 3mlを下層に積層する。次にこの懸濁液を500gで30分間遠心分離する。血漿層を取って清浄な管に移し、500gで再度10分間遠心分離する。細胞ペレットをPBSで洗浄し、細胞遺伝学的調製のために通常用いられる標準技術に従い3:1のメタノール:酢酸で固定する。

【0050】

3. スライドの調製および固定

固定した細胞懸濁液をシラン処理した顕微鏡スライド上に乗せ、放置乾燥させる。この細胞懸濁液をさらにcoplin jar内で10分間ホルムアルデヒド固定し (50 ml PBS、0.5g $MgCl_2$ 、1.3mlホルムアルデヒド)、エタノール系列 (70%、95%、100%) で脱水し、風乾する。

【0051】

4. エキソヌクレアーゼ酵素消化

実施例1 (段落5) に記載のプロトコルに従いBal 31酵素3単位で酵素消化を実施する。

5. 汎テロメア、Yおよび21プローブの組み合わせを用いるFISH

全テロメアジゴキシゲニン標識化プローブ (Appligene Oncor) 0.5 μ l、LSI第21染色体橙色スペクトルプローブ (Vysis Ltd.) 1 μ lおよびCEP (III) 水色スペクトルプローブ (Vysis Ltd) 1 μ lを、各々のスライド用のHybrisol VI (Oncor Appligene) 7.5 μ lと混合する。このプローブミックス10 μ lを標的細胞を含む顕

微鏡スライド上に置く。次いでスライドを75 °Cのホットプレート上で5分間変成させ、ゴム溶液で密封し、37 °Cの加湿室で一夜ハイブリダイズさせる。

【0052】

ハイブリダイゼーション後洗浄を翌日行う。スライドは50%ホルムアミド中、4 °Cで15分間、2xSSC中37 °Cで8分間、次いで1xPBT中、室温で洗浄する。フルオレセイン標識化抗ジゴキシゲニン抗体30 µlをスライド上に乗せ、5分間37 °Cに維持する。最後に、スライドを1xPBTで2分間3回洗浄し、風乾し、DAPIで対比染色する。

【0053】

6. 顕微鏡分析

スライドをx40対物レンズを付けたZeiss axioplan epifluorescence顕微鏡を用いてスクリーニングする。適当なフィルターを用いてシグナルを観察し、SmartCapture画像取得および解析系 (Vysis/Applied Imaging) を用いるCCDカメラを使用して画像を取得し、適切な画像を保存する。

【0054】

合計1000個の細胞核を調査する。大多数、即ち995/1000 (99.5%) はテロメア (緑色) シグナルを含んでおらず、これらは母体起源のものであると解釈できる。FITC、橙色スペクトルおよび水色スペクトルフィルターを用いて、残り5個の核の画像を捕捉する。これら5/1000の核は緑色テロメアシグナルと水色Yシグナルの両者を含み、故に雄性胎児起源のものであると解釈できる。ところがこれら5個の核は3個の赤色シグナルをも含み、これは、この胎児が、ダウン症候群を予想する核型47,XY+21を持っているかも知れないことを示している。

【0055】

要約および結論

PercolI勾配により血漿画分中の胎児細胞を濃縮した後、テロメア配列の存在の同定とYおよび第21染色体シグナルの計数のため、プローブカクテルTel/Y/21を用いてFISH調査を実施する。

この実施例は、インビトロでの酵素による潤濁後に残存するテロメア蛍光によって本質的に胎児起源であると診断できる、細胞核中の、適用したプローブカク

テルY/21に関する染色体構成を同定することが可能であることを例示する。この組み合わせは、胎児が雄性であり且つ21トリソミーダウン症候群を持つか否かについて結論を引き出すことができる。

【0056】

実施例3

母体血液からの胎児47,XX,+21ダウン症候群の出生前診断

1. 妊娠および血液試料

地域倫理委員会からの倫理上の承諾と共に書面でのインフォームドコンセントを得た後、在胎齢16週の妊娠女性から静脈穿刺により血液12mlを採取し2本のエドト酸(EDTA)管に入れる。

【0057】

2. 胎児細胞の濃縮

母体血液由来の血漿中の胎児有核細胞の濃縮を、些少の改変を施した記載のプロトコル(Ganshirt et al., Diagnostic Cytogenetics, Springer Lab Manual, 1999 R.-D. Wagner, Fetal Cells in Maternal blood, pp401-415)に従いTriple Density Gradientを用いて実施する。

【0058】

EDTA血液12mlを燐酸緩衝溶液(PBS)12mlに加え、管を逆さにすることにより混合する。この血液/PBS混合物6mlをピペットで4本の15mlポリスチレン管に入れる。注射筒に取り付けた細長いカニューレを用いて3層のPercoll(登録商標)(Amersham Pharmacia)を下層に積層する。最初に40% Percoll 3mlを、その後45% Percoll 3mlおよび50% Percoll 3mlを下層に積層する。次にこの懸濁液を500gで30分間遠心分離する。血漿層を取って清浄な管に移し、500gで再度10分間遠心分離する。細胞ペレットをPBSで洗浄し、細胞遺伝学的調製のために通常用いられる標準技術に従い3:1のメタノール:酢酸で固定する。

【0059】

3. スライドの調製および固定

固定した細胞懸濁液をシラン処理した顕微鏡スライド上に乗せ、放置乾燥させる。この細胞懸濁液をさらにcoplin jar内で10分間ホルムアルデヒド固定し(50

ml PBS、0.5g $MgCl_2$ 、1.3mlホルムアルデヒド)、エタノール系列(70%、95%、100%)で脱水し、風乾する。

【0060】

4. エキソヌクレアーゼ酵素消化

実施例1(段落5)に記載のプロトコルに従いBaI 31酵素3単位で酵素消化を実施する。

5. 汎テロメア、X/Y、13、18および21プローブの組み合わせを用いるFISH

全テロメアジゴキシゲニン標識化プローブ(Appligene Oncor) 0.5 μ lを、ピオチン標識化StarFISHヒト染色体汎テロメアプローブ(Cambio) 0.5 μ lと混合する。次にこのテロメアミックスをMultiVysion(登録商標) PGT (Vysis Ltd) 10 μ lと混合する。このプローブミックスを標的細胞を含む顕微鏡スライド上に置く。次いでスライドを75 °Cのホットプレート上で5分間変成させ、ゴム溶液で密封し、37 °Cの加湿室で一夜ハイブリダイズさせる。

【0061】

ハイブリダイゼーション後洗浄を翌日行う。スライドは50%ホルムアミド中、43 °Cで15分間、2xSSC中37 °Cで8分間、次いで1xPBT中、室温で洗浄する。前もって混合しておいたDual Colour検出試薬(Oncor Appligene) 30 μ lをスライド上に乗せ、5分間37 °Cに維持する。最後に、スライドを1xPBTで2分間3回洗浄し、風乾し、DAPIで対比染色する。

【0062】

6. 顕微鏡分析

スライドをx40対物レンズを付けたZeiss axioplan epifluorescence顕微鏡を用いてスクリーニングする。適当なフィルターを用いてシグナルを観察し、SmartCapture画像取得および解析系(Vysis/Applied Imaging)を用いるCCDカメラを使用して画像を取得し、適切な画像を保存する。

【0063】

合計1000個の細胞核を調査する。大多数、即ち995/1000(99.5%)はテロメア(黄色)シグナルを含んでおらず、これらを仮に母体起源のものであると解釈する。FITC、橙色スペクトル、水色スペクトルおよび金色スペクトルフィルターを

用いて、残り5個の核の画像を捕捉する。これら5/1000の核は黄色テロメアシグナルを含み、故に胎児起源のものであると解釈できる。

【0064】

これらの核は例えば、第13染色体を示す2個の赤色シグナル、第21染色体を示す2個の緑色シグナル、X染色体を示す2個の水色シグナル、および第18染色体に対応する3個の青色シグナルをも含むが、Y染色体を示す金色シグナルは持っていないかも知れない。このようなパターンは、この胎児が、エドワード症候群を予想する核型47,XX+18を持っていることを示している。

【0065】

要約および結論

Percoll勾配により血漿画分中の胎児細胞を濃縮した後、テロメア配列の存在の同定と第13、18、X、Yおよび21染色体シグナルの計数のため、プローブカクテルTel/13/18/X/Y/21を用いてFISH調査を実施する。

この実施例は、インビトロでの酵素による潤濁後に残存するテロメア蛍光によって本質的に胎児起源であると診断できる、細胞核中の染色体構成（プローブカクテル13/18/X/Y/21に関する）を同定することが可能であることを例示する。この組み合わせは、胎児が雌性であり且つエドワード症候群を持つか否かについて結論を引き出すことができる。

【0066】

実施例4

母体血液からの胎児47,XXYクラインフェルター症候群の出生前診断

1. 妊娠および血液試料

地域倫理委員会からの倫理上の承諾と共に書面でのインフォームドコンセントを得た後、在胎齢16週の妊娠女性から静脈穿刺により血液12mlを採取し2本のエドト酸（EDTA）管に入れた。

【0067】

2. 胎児細胞の濃縮

母体血液由来の血漿中の胎児有核細胞の濃縮を、些少の改変を施した記載のプロトコル（Ganshirt et al., Diagnostic Cytogenetics, Springer Lab Manual,

1999 R.-D. Wagner, Fetal Cells in Maternal blood, pp401-415) に従い Triple Density Gradient を用いて実施した。

【0068】

EDTA血液12mlを燐酸緩衝溶液(PBS)12mlに加え、管を逆さにすることにより混合する。この血液/PBS混合物6mlをピペットで4本の15mlポリスチレン管に入れる。注射筒に取り付けた細長いカニューレを用いて3層のPercoll(登録商標)(Amersham Pharmacia)を下層に積層する。最初に40% Percoll 3mlを、その後45% Percoll 3mlおよび50% Percoll 3mlを下層に積層する。次にこの懸濁液を500gで30分間遠心分離する。血漿層を取って清浄な管に移し、500gで再度10分間遠心分離する。細胞ペレットをPBSで洗浄し、細胞遺伝学的調製のために通常用いられる標準技術に従い3:1のメタノール:酢酸で固定する。

【0069】

3. スライドの調製および後固定

固定した細胞懸濁液をシラン処理した顕微鏡スライド上に乗せ、放置乾燥させる。この細胞懸濁液をさらにcoplin jar内で10分間ホルムアルデヒド固定し(50 ml PBS、0.5g $MgCl_2$ 、1.3mlホルムアルデヒド)、エタノール系列(70%、95%、100%)で脱水し、風乾する。

【0070】

4. エキソヌクレアーゼ酵素消化

実施例1(段落5)に記載のプロトコルに従いBal 31酵素3単位で酵素消化を実施する。

5. 汎Telおよび18/X/Yプローブの組み合わせを用いるFISH標識化

Aneuvysion CEP 18/X/Y (Vysis Ltd) 9.5 μ lおよび全テロメアジゴキシゲニン標識化プローブ(Oncor) 0.5 μ lをスライド上に置きカバーガラスをかける。次いでスライドを75 °Cのホットプレート上で5分間変成させ、ゴム溶液で密封し、37 °Cの加湿室で一夜ハイブリダイズさせる。

【0071】

ハイブリダイゼーション後洗浄を翌日行う。スライドは50%ホルムアミド中、4°Cで15分間、2xSSC中37 °Cで8分間、次いで1xPBT中、室温で洗浄する。フルオレ

セイン標識化抗ジゴキシゲニン抗体30 μ lをスライド上に乗せ、5分間37℃に維持する。最後に、スライドを1xPBTで2分間3回洗浄し、風乾し、4',6-ジアミノ-2-フェニルインドール (DAPI、Vectashield Ltd) 1滴で対比染色する。

【0072】

6. 顕微鏡分析

スライドをx40対物レンズを付けたZeiss axioplan epifluorescence顕微鏡を用いてスクリーニングする。適当なフィルターを用いてシグナルを観察し、SmartCapture画像取得および解析系 (Vysis/Applied Imaging) を用いるCCDカメラを使用して画像を取得し、適切な画像を保存する。

【0073】

合計1000個の細胞核を調査する。大多数、即ち995/1000 (99.5%) はテロメア (緑色) シグナルを含んでおらず、これらは母体起源のものであると解釈できる。これに対して、5個の核はテロメアシグナルおよびYシグナルを含み、これらは胎児起源であると解釈できる。

これら5個のうち4個の核には、クラインフェルター症候群を予想する胎児核型47,XXYに合致するシグナルの組み合わせである、2個のXシグナルがあるかも知れない。残りの細胞は、正常な46,XY雄性であると考えられる1個のXと1個のYを持っているかも知れない。5個の細胞全てが第18染色体を示す2個のシグナルを持つかも知れない。

【0074】

このような場合、胎児はクラインフェルター症候群に合致する核型47,XXYを持っていると結論付けることが可能である。しかしながら、XY染色体構成を持つ1個の細胞核の存在がXハイブリダイゼーションの失敗の技術的所産 (偽陰性胎児細胞) を表すという可能性と、またはそうではなく実はこの胎児は核型46,XY[1]/47,XXY[4]を持つクラインフェルターモザイクであるという可能性を区別できないということには留意すべきである。

【0075】

要約および結論

PercolI勾配により血漿画分中の胎児細胞を濃縮した後、X、Yおよび第18染色

体の計数のためのプローブカクテルX/Y/18 (Visis Ltd)、およびテロメア配列の同定のための全テロメアジゴキシゲニン標識化プローブ (Appligene Oncor) を用いてFISH調査を実施できる。

【0076】

この実施例は、インビトロでの酵素による潤湯後に残存するテロメア蛍光によって胎児起源であると診断できる、細胞核中の、プローブカクテルX/Y/18に関する胎児染色体構成を、汎テロメアプローブを用いて同定することが可能であることを例示する。XXYおよびXYおよびテロメア蛍光を持つ細胞核間の一致に基づき、本発明者等は、この胎児が非モザイク型またはモザイク型のクラインフェルター症候群を持つと結論を下すことができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】

母体および胎児染色体 / DNAに見出されるテロメアの相違およびこれに及ぼす酵素消化の影響を模式的に示すものであり；

【図2】

(a) テロメア特異的FISHプローブ、および(b) Y染色体特異的FISHプローブ、を使用する母体および胎児細胞の混合集団の、本発明方法を用いた分析結果を模式的に示すものであり；

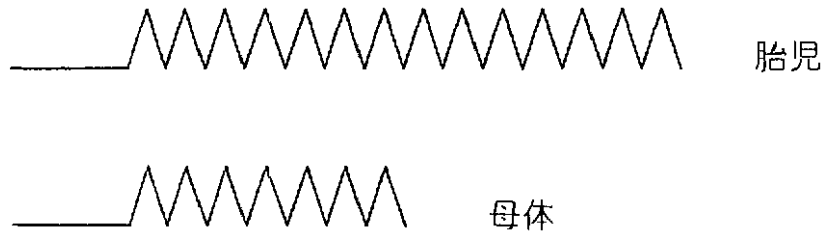
【図3】

(a) テロメア特異的FISHプローブ、および(b)第21染色体特異的FISHプローブ、を使用する母体および胎児細胞の混合集団の、本発明方法を用いた分析結果を模式的に示すものである。

【図1】

テロメアの相違

—テロメアの長さの相違



—酵素消化

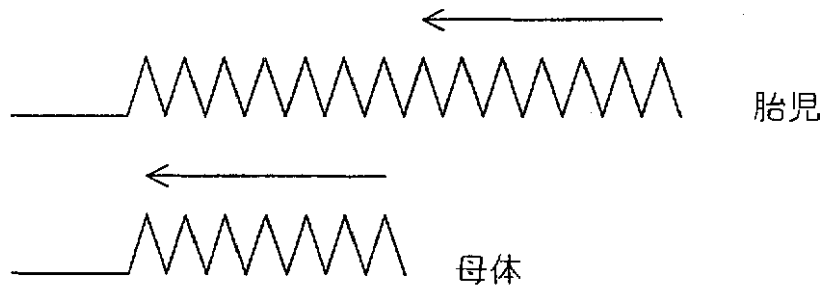


FIGURE 1

【図2】

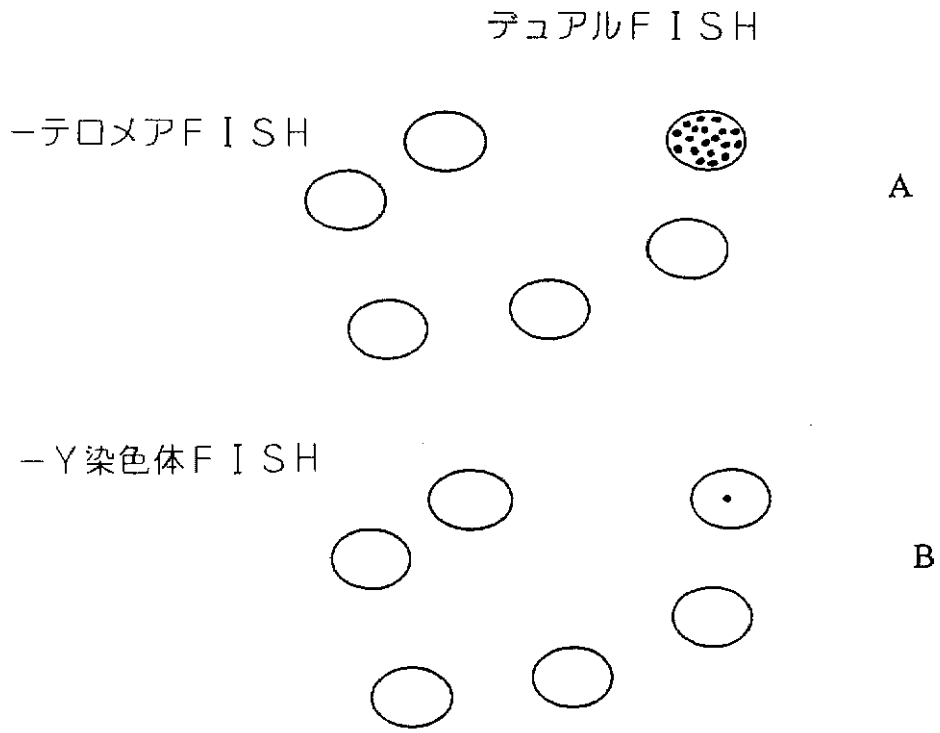


FIGURE 2

【図3】

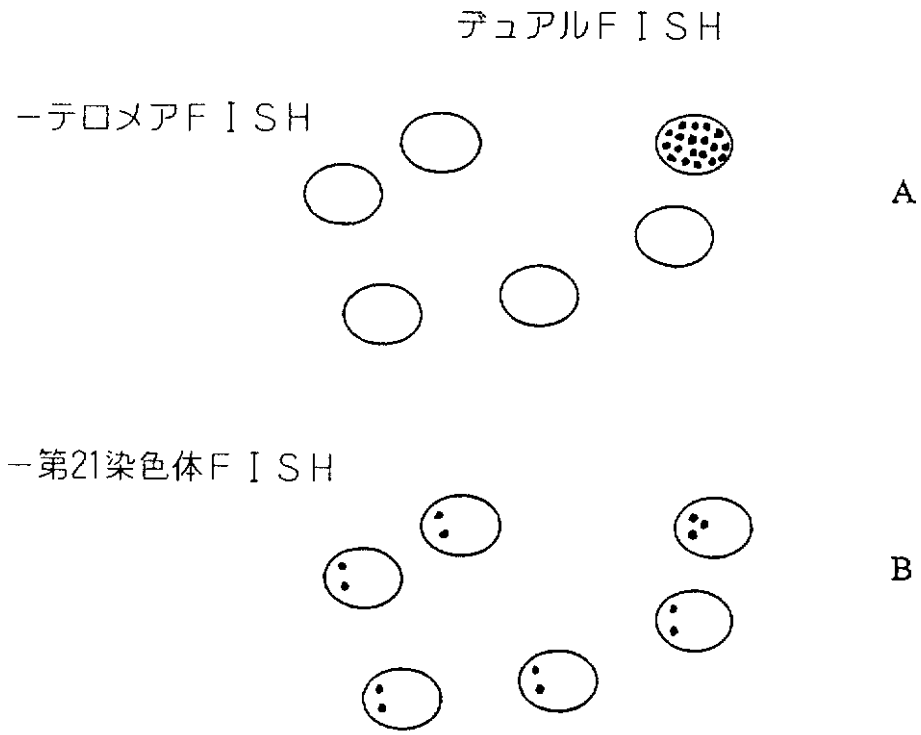


FIGURE 3

【國際調查報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International Application No. PCT/GB 01/01767
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12Q1/68		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, CHEM ABS Data, SCISEARCH, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 430 402 A (UNIV CALIFORNIA) 5 June 1991 (1991-06-05) claims 73,85	25-28,30
A	WO 98 39474 A (LO YUK MING DENNIS;WAINSCOAT JAMES STEPHEN ; ISIS INNOVATION (GB)) 11 September 1998 (1998-09-11) claims 1-16	1-24,29
A	WO 94 02646 A (RES DEV FOUNDATION ;ASGARI MORTEZA (US); PRASHAD NAGINDRA (US); CU) 3 February 1994 (1994-02-03) claims 1-14	1-24,29
	-/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents :		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *&* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 3 June 2002		Date of mailing of the international search report 13/06/2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx: 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Gabriels, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/GB 01/01767

C:(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>YOUNGREN KJELL ET AL: "Synchrony in telomere length of the human fetus." HUMAN GENETICS, vol. 102, no. 6, June 1998 (1998-06), pages 640-643, XP002200862 ISSN: 0340-6717 the whole document</p>	1-24,29
A	<p>IWAMA HIROSHI ET AL: "Telomeric length and telomerase activity vary with age in peripheral blood cells obtained from normal individuals." HUMAN GENETICS, vol. 102, no. 4, April 1998 (1998-04), pages 397-402, XP002200863 ISSN: 0340-6717 page 400 -page 401</p>	1-24,29

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/GB 01/01767

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0430402	A	05-06-1991	AT 176281 T	15-02-1999
			AU 647741 B2	31-03-1994
			AU 5898790 A	06-06-1991
			CA 2021489 A1	20-01-1991
			DE 69032920 D1	11-03-1999
			DE 69032920 T2	09-09-1999
			EP 0430402 A2	05-06-1991
			EP 0885971 A2	23-12-1998
			IE 902727 A1	05-06-1991
			IL 94906 A	31-10-1995
			JP 3224499 A	03-10-1991
			NZ 234529 A	23-12-1993
			NZ 245427 A	26-07-1994
			PT 94751 A	20-03-1991
			US 5756696 A	26-05-1998
			US 5721098 A	24-02-1998
			US 6344315 B1	05-02-2002
			US 6132961 A	17-10-2000
			US 6280929 B1	28-08-2001
			US 6159685 A	12-12-2000
ZA 9005561 A	24-04-1991			
WO 9839474	A	11-09-1998	AU 727919 B2	04-01-2001
			AU 6507498 A	22-09-1998
			EP 0994963 A1	26-04-2000
			WO 9839474 A1	11-09-1998
			JP 2001513648 T	04-09-2001
			US 6258540 B1	10-07-2001
			US 2001051341 A1	13-12-2001
WO 9402646	A	03-02-1994	AU 4685593 A	14-02-1994
			BR 9306867 A	08-12-1998
			CA 2140278 A1	03-02-1994
			EP 0662152 A1	12-07-1995
			JP 7509136 T	12-10-1995
			WO 9402646 A1	03-02-1994
			US 5629147 A	13-05-1997
			US 5766843 A	16-06-1998
			US 5861253 A	19-01-1999
			US 5858649 A	12-01-1999

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マ-ト (参考)
G 0 1 N 33/58		C 1 2 N 15/00	A
(81)指定国	EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW		
Fターム(参考)	2G045 BA14 BB14 BB22 BB50 BB51 CA25 CB30 DA13 FA16 FB02 FB12 GC15 4B024 AA11 CA01 CA09 HA12 4B063 QA01 QA13 QA19 QQ02 QQ03 QQ42 QR14 QR41 QR56 QR66 QR82 QS03 QS11 QS12 QS34 QS36 QX02		

专利名称(译)	临床诊断方法		
公开(公告)号	JP2003530892A	公开(公告)日	2003-10-21
申请号	JP2001578696	申请日	2001-04-20
[标]申请(专利权)人(译)	SIMEG		
申请(专利权)人(译)	Shimegu Rimitido		
[标]发明人	ヒュルテンマイアニータ		
发明人	ヒュルテン,マイ アニータ		
IPC分类号	G01N33/53 C12N15/09 C12Q1/34 C12Q1/68 C12Q1/6883 G01N33/566 G01N33/58		
CPC分类号	C12Q1/6883 C12Q2600/156		
FI分类号	C12Q1/68.A C12Q1/34 G01N33/53.M G01N33/566 G01N33/58.A C12N15/00.A		
F-TERM分类号	2G045/BA14 2G045/BB14 2G045/BB22 2G045/BB50 2G045/BB51 2G045/CA25 2G045/CB30 2G045/DA13 2G045/FA16 2G045/FB02 2G045/FB12 2G045/GC15 4B024/AA11 4B024/CA01 4B024/CA09 4B024/HA12 4B063/QA01 4B063/QA13 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ03 4B063/QQ42 4B063/QR14 4B063/QR41 4B063/QR56 4B063/QR66 4B063/QR82 4B063/QS03 4B063/QS11 4B063/QS12 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QX02		
优先权	2000009784 2000-04-20 GB		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

一种鉴定母体血液或阴道样品中胎儿细胞核，染色体或DNA的方法，其包括：(a)通过使样品中细胞核的染色体经受酶促核酸外切酶消化来去除每个染色体的末端区域。并且(b)检测由于该消化过程而残留在胎儿DNA中而不存在于母体DNA中的DNA序列的存在。一经鉴定，即可对该胎儿DNA进行诊断，例如检测染色体异常。

